

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Freiburg
(Direktor: Professor Dr. HELMUT HOLZER)

Versuche zur Alkylierung von Nicotinamid und Nicotinsäure durch Tetramin und andere carcinostatische Verbindungen

Kurzfassung der
Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg i. Br.

vorgelegt von
Wolfgang Duntze
aus
Karlsruhe

1962
2

Dekan: Professor Dr. HERMANN KRAUSS
Referent: Professor Dr. HELMUT HOLZER

Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG, Würzburg



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Freiburg i.Br.
(Direktor: Prof. Dr. H. HOLZER)

Alkylierung von Nicotinsäureamid und Nicotinsäure durch Tetramin (1-Aziridino-2-hydroxy-buten-3) und andere carcinostatische Äthylenimin-Verbindungen

Von

W. DUNTZE*, H. W. GOEDDE, S. FRANK und H. HOLZER

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 11. Dezember 1961)

Tetramin (OETTEL u. WILHELM 1954; VIERLING et al. 1957) hemmt wie andere carcinostatische Äthylenimin-Verbindungen die Glykolyse von Ascites-Tumorzellen durch Senkung des DPN¹-Gehaltes (DUNTZE 1962; GOEDDE u. HOLZER 1960). Für den Mechanismus der Wirkung von carcinostatischen Äthylenimin-Verbindungen (Aziridin-Verbindungen) diskutierten wir entweder eine Beeinflussung von Enzymen, die an der Synthese bzw. am Abbau des DPN beteiligt sind (SCRIBA et al. 1960) oder eine direkte chemische Reaktion von Zwischenprodukten des DPN-Stoffwechsels mit Äthylenimin-Verbindungen (GOEDDE u. HOLZER 1960; HOLZER, DUNTZE et al. 1958). Für die zweite Möglichkeit war die Beobachtung (DUNTZE 1962; GOEDDE u. HOLZER 1960; HOLZER, DUNTZE et al. 1958) von besonderem Interesse, daß Nicotinsäureamid mit Tetramin nicht-enzymatisch eine Substanz bildet, die mit Cyanid einen bei 340 m μ absorbierenden Komplex ergibt. Auf Grund der charakteristischen Cyanidreaktion war zu vermuten, daß es sich bei dem entstandenen Produkt um eine durch Alkylierung des Pyridin-Stickstoffs gebildete Pyridinium-Verbindung handle. In der vorliegenden Arbeit wird diese Vermutung experimentell bestätigt. Es werden Synthese und Strukturaufklärung der Alkylierungsprodukte von Nicotinsäureamid und Nicotinsäure beschrieben sowie Kinetik und Ausmaß der Alkylierungsreaktionen und ihre Bedeutung für die cytostatische Wirkung näher untersucht.

Methoden und Präparate

1. *Tumorzellen.* Die Ehrlich-Ascites-Zellen wurden gewonnen wie früher beschrieben (HOLZER u. BOLTZE 1961). Zur Bestimmung des Zellvolumens wurde die Ascites-Suspension im Kafka-Röhrchen 4 min bei 1200 $\times$ g zentrifugiert. Für in-vitro-Versuche wurden außer Zellen des Ehrlich-Ascites-Carcinoms die Ascitesform des Yoshida-Sarkoms verwandt, für Untersuchungen an soliden Impftumoren der Ratte das Jensen-Sarkom.

2. *Manometrie.* Prinzipiell wurden die manometrischen Messungen wie früher beschrieben (HOLZER u. BOLTZE 1961; HOLZER et al. 1958) durchgeführt. Die Asciteszellen wurden zur Messung der anaeroben Glykolyse bei 37° C in Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung inkubiert,

* Ein wesentlicher Teil der vorliegenden Arbeit ist der Dissertation von WOLFGANG DUNTZE an der Medizinischen Fakultät der Universität Freiburg i.Br. entnommen.

¹ Abkürzungen: A 139 = Bayer-Präparat 2,5-bis-methoxyäthoxy-3,6-bis-aziridinobenzo-
chinon; DC = Dichloren (Methyl-bis-(β -chloräthyl)-amin); DPN = Diphosphopyridinnucleo-
tid; NS = Nicotinsäure; NSA = Nicotinsäureamid; MT = Mitomen (Methyl-bis-(β -chloräthyl)-
amin-N-oxyd); TA = Tetramin (1-Aziridino-2-hydroxybuten-3); TA-NS = N-Tetramyl-Nico-
tinsäure; TA-NSA = N-Tetramyl-Nicotinsäureamid; TEM = Triäthylenmelamin.

deren p_H durch Begasen mit 100% CO_2 auf 6,0 eingestellt war. Start der Glykolyse durch Einkippen der Zellen oder von Glucose (Endkonzentration 0,025 M). Bei Versuchen mit Cytostatica wurden Doppelkipper-Gefäße benutzt und die Lösung des Cytostaticums ebenfalls erst zu Versuchsbeginn zugekippt, um eine Inaktivierung der Cytostatica zu vermeiden.

3. Enzymextrakte aus Tumorzellen; Aufschluß von Tumorzellen zur Bestimmung von DPN, Tetramyl-NSA, NSA und NS. Durch Frieren und Tauen wurden aus wäßrigen Suspensionen von Asciteszellen Enzymextrakte gewonnen (s. auch HOLZER u. BOLTZE 1961); Jensen-Sarkom wurde durch Homogenisieren in vierfachem Volumen Eiswasser (g/v) aufgeschlossen.

Zur Bestimmung von DPN, Tetramyl-NSA, NSA und NS wurden Asciteszellen und solide Tumoren mit 5%iger eiskalter Trichloressigsäure oder 6%iger Perchlorsäure (jeweils 4ml/g Tumorgewebe) im Potter-Elvehjem-Tissue-Grinder homogenisiert; die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert und die Überstände neutralisiert.

4. Bestimmung von NSA und NS mit Bromcyan und Barbitursäure [vgl. KÖNIG 1904; KRÖGER et al. (2) 1960; LISBOA 1957]. Nach der von KRÖGER et al. (2) ausgearbeiteten Vorschrift wurden Proben der neutralisierten Trichloressigsäure- bzw. Perchlorsäureextrakte mit Bromcyan umgesetzt und die Absorption des NSA-Produktes bei 410 $m\mu$, des Nicotinsäureproduktes bei 330 $m\mu$ gemessen. DPN bewirkt bei beiden Wellenlängen eine geringe Störung, die nach enzymatisch-optischer Bestimmung der DPN-Konzentration bei der Berechnung berücksichtigt werden muß [KRÖGER et al. (2) 1960]. Diese erfolgt nach den Gleichungen:

$$\mu M_{NSA} = E_{NSA}^{410} \times 0,306 \text{ bzw. } \mu M_{NS} = E_{NS}^{330} \times 0,48.$$

5. Bestimmung von DPN- und N-Tetramyl-NSA im Cyanid-Test (COLOWICK et al. 1951). Zur Bestimmung der mit Cyanid reagierenden Substanzen wurden 0,6 ml der zu untersuchenden Lösung mit 2,4 ml einer 1 M wäßrigen KCN-Lösung versetzt. Die Extinktions-

messungen wurden im Spektrophotometer (Zeiss PM Q II) 10 min nach Zusatz der Cyanid-Lösung gegen einen Blindwert von 0,6 ml Wasser und 2,4 ml 1 M KCN-Lösung bei 340 $m\mu$ oder im Photometer Eppendorf bei 366 $m\mu$ durchgeführt; $d = 1$ cm. Das Maximum von DPN-CN liegt bei 325 $m\mu$

(COLOWICK et al. 1951), das von Tetramyl-NSA-CN bei 340 $m\mu$ (Abb. 1). Die Extinktionen der CN-Komplexe bekannter Konzentrationen DPN und Tetramyl-NSA wurden in vergleichenden Messungen bestimmt und daraus die Extinktionskoeffizienten für 340 $m\mu$ und 366 $m\mu$ berechnet (vgl. Tabelle 1).

Die Kenntnis der Extinktionskoeffizienten bei 340 $m\mu$ ermöglicht es, DPN und Tetramyl-NSA durch Bestimmung von DPN im enzymatischen Test mit Alkoholdehydrogenase und Messung der Extinktion beider Verbindungen im Cyanid-Test bei 340 $m\mu$ nebeneinander zu erfassen. Die Cyanid-Extinktion der im enzymatisch-optischen Test mit Alkoholdehydrogenase gefundenen DPN-Konzentration wird berechnet und von der tatsächlich gemessenen Cyanid-Extinktion subtrahiert. Der enzymatisch-optische Test für DPN wurde wie früher angegeben (HOLZER et al. 1958; HOLZER et al. 1954) durchgeführt.

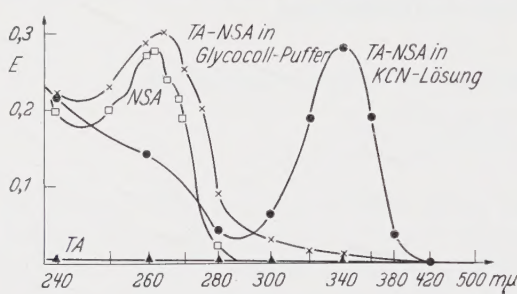


Abb. 1. Absorptionsspektren von NSA, TA und TA-NSA. Alle Messungen in $1,0 \times 10^{-1}$ M Glykokoll-NaOH-Puffer p_H 11,0 bzw. in 1 M KCN-Lösung vom p_H 11,0. Konzentrationen von NSA, TA, TA-NSA 0,2 μ M. $d = 1$ cm. NSA und TA weisen in KCN-Lösung und Glykokoll-Puffer die gleichen Spektren auf

Tabelle 1

	Molarer Extinktionskoeffizient [cm ² × Mol ⁻¹]	
	340 $m\mu$	366 $m\mu$
Cyanidkomplex von DPN	$4,93 \times 10^6$	$0,82 \times 10^6$
Cyanidkomplex von Tetramyl-NSA	$4,30 \times 10^6$	$2,45 \times 10^6$

6. *Fluorimetrische Bestimmung* (HUFF u. PERLZWEIG 1947) von DPN und N-Tetramyl-NSA. 2,0 ml der Probe wurden mit 0,5 ml Aceton und 0,2 ml 6 N NaOH versetzt, nach 5 min 0,3 ml 6 N HCl zugegeben, gut durchmischt und 2 min im kochenden Wasserbad inkubiert. Dann wurde schnell abgekühlt, mit 1,0 ml 20%iger KH_2PO_4 -Lösung pH 2,0–2,5 eingestellt und im Photometer Eppendorf mit Zusatzgerät für Fluorimetrie gemessen (Hg-Lampe; Vorsatzfilter für Durchlässigkeit 300–400 m μ). Zur Messung der Emissionsspektren wurde das Fluoreszenz-Zusatzgerät ZFM 4 des Zeiss-Spektrophotometers PMQ II benutzt.

7. *Präparative Darstellung von N-Tetramyl-Nicotinsäureamidchlorid-hydrochlorid*. Nicotinsäureamid und Tetramin wurden in äquimolarem Verhältnis in Wasser gelöst; die Endkonzentration beider Substanzen war 2,4 M. Dann wurde an der Glaselektrode mit 2 N HCl pH 4,8 eingestellt und mehrere Stunden bei 50° C inkubiert, bis bei der Prüfung im KCN-Test keine Extinktionszunahme mehr festzustellen war. Die gelbgefärbte Lösung wurde im Vakuum über Phosphorpentoxid eingengt. Es resultierte eine gelbe klebrige Flüssigkeit mit einer Ausbeute von 85%. Nach häufigem Umkristallisieren aus viel heißem Äthanol wies die nun farblose Substanz einen Schmelzpunkt von 178–180° C (unkorr.) auf. Analyse des N-Tetramyl-Nicotinsäureamid-chlorid-hydrochlorid (Molekulargewicht 308,2; $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{O}_2\text{N}_3\text{Cl}_2$):

ber. C 46,76; H 6,22; N 13,63; Cl 23,00

gef. C 46,56; H 6,47; N 13,63; Cl 22,84.

Bei der Bromtitration der aliphatischen Doppelbindung wurden statt der für eine C=C-Bindung berechneten 100 μM Br_2 (für 30,82 mg eingesetztes TA-NSA = 100 μM) 105 μM Br_2 verbraucht. Die Benzoylierung nach SCHOTTEN-BAUMANN ergab eine weiße, kristallisierte, sehr hygroskopische Substanz; die Baeyersche Probe mit Permanganat war positiv. Weitere Eigenschaften der Verbindung; die Löslichkeit in Wasser war sehr gut, in Methanol und heißem Äthanol gut. Maximum der UV-Absorption 263 m μ ; nach Zusatz von Cyanid 340 m μ (vgl. Abb. 1). Das Maximum der Fluoreszenz nach Behandlung mit Aceton in alkalischem Milieu lag bei 452 m μ (vgl. Abb. 3). Die Substanz ist in saurem Milieu beständig. Bei pH 11,5 sank durch 20 min Inkubation bei 50° C die Extinktion einer Probe im KCN-Test von 0,255 auf 0,008. Das Absorptionsmaximum des Tetramyl-NSA bei 263 m μ war nach der alkalischen Hydrolyse verschwunden. Bei der Chromatographie von sauer hydrolysiertem Tetramin sowie von alkalisch hydrolysiertem Tetramyl-NSA in Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5) ergab sich zusätzlich zu den Flecken der nicht hydrolysierten Verbindungen ein neuer Fleck mit übereinstimmendem R_f -Wert. Es dürfte sich um das offenkettige, sekundäre Amin des Tetramins handeln, das bei der Hydrolyse der Pyridiniumverbindung zu erwarten ist.

8. *Präparative Darstellung von N-Tetramyl-Nicotinsäuremonopikrat*. Nicotinsäure und Tetramin wurden in wäßriger Lösung bei 50° C zu einer Konzentration von 0,45 M gelöst und an der Glaselektrode mit 2 N HCl auf pH 4,8 eingestellt. Nach 8 Std bei 50° C wurde die tiefgelb gefärbte Lösung über Phosphorpentoxid im Vakuum eingengt. Versuche, die sehr visköse gelbe Substanz (Ausbeute etwa 70%) zu kristallisieren, fielen in den verschiedensten Lösungsmitteln negativ aus. Deshalb wurde in Äthanol gelöst und das Pikrat dargestellt. Nach häufigem Umkristallisieren erhielt man mit einer Ausbeute von 25% N-Tetramyl-Nicotinsäure-monopikrat (Schmelzpunkt 185–187° C, unkor.). (Molekulargewicht 465,37; $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{O}_{10}\text{N}_5$):

ber. C 46,45; H 4,12; N 15,05

gef. C 46,39; H 4,38; N 15,08.

Die Baeyersche Probe mit Permanganat war positiv, die Prüfung auf Chloridionen negativ.

9. *Zerlegung von N-Tetramyl-Nicotinsäure-monopikrat*. Die Substanz wurde mit halbkonzentrierter Salzsäure versetzt und fein zerrieben; dabei löste sie sich zum Teil; zurück blieb ein weißgelber Niederschlag, der von der Lösung abgetrennt und mehrfach mit verdünnter Salzsäure ausgewaschen wurde. Das Washwasser wurde mit der Lösung vereinigt und wiederholt mit Nitrobenzol ausgeschüttelt, um noch vorhandene Pikrinsäure zu entfernen. Nach Abtrennung des Nitrobenzols wurde die wäßrige Phase mehrmals mit Äther ausgeschüttelt, im Vakuum eingengt und bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Substanz war kristallin, aber sehr stark hygroskopisch; Ausbeute 80%. Man errechnet das

Molekulargewicht des N-Tetramyl-Nicotinsäure-chlorid-hydrochlorids zu 309,19. Analysenergebnis ($C_{12}H_{18}O_3N_2Cl_2$):

ber.: N 9,07; Cl 22,92

gef.: N 8,95; Cl 22,52.

Die Entfärbung von Brom in Tetrachlorkohlenstoff und die Baeyersche Probe waren positiv.

10. *Präparate*. DPNase wurde aus Rindermilz nach der Vorschrift von KAPLAN (1955) gewonnen. Tetramin-Merck/BASF (1-Aziridino-2-hydroxybuten-3) wurde uns freundlicherweise von Herrn Dr. W. SCHMIDT, Merck, Darmstadt, überlassen. Herrn Prof. Dr. H. OETTEL danken wir für 1-Aziridino-2-hydroxybutan, Herrn Dozent Dr. MARXER, Ciba, Basel, für Dichloren (Methyl-bis-(β -chloräthyl)-amin). Die ASTA-Werke überließen uns Endoxan (N-bis-(β -chloräthyl)-N-propylen-phosphorsäurediamid) und Mitomen (Methyl-bis-(β -chloräthyl)-amin-N-oxyl). Die Farbwerke Hoechst stellten uns TEM (2,4,6-Triaziridino-1,3,5-Triazin) zur Verfügung.

Ergebnisse

I. Wirkung von Tetramin auf Glykolyse und DPN-Spiegel von Yoshida-Ascites-Zellen

BURCHENAL u. Mitarb. sowie ROSE u. Mitarb. entdeckten 1950, daß die Äthylenimin-Verbindung Triäthylenmelamin (TEM) das Wachstum von Tumoren hemmt. Wie OETTEL und WILHELM (1957) zeigen konnten, übt auch Tetramin auf solide Impftumoren der Ratte eine starke carcinostatische Wirkung aus. Tabelle 2 zeigt, daß Tetramin ebenso die Glykolyse von Ascites-Tumorzellen durch Senkung des DPN-Gehaltes hemmt, wie dies früher (HOLZER et al. 1958; HOLZER und KRÖGER 1958; ROITT 1956) für andere Äthylenimin-Verbindungen nachgewiesen wurde. Durch hohe Nicotinsäureamid-Konzentrationen läßt sich auch hier die Hemmung wieder aufheben. Aus der letzten Spalte der Tabelle ist ersichtlich, daß der Trichloressigsäure-Extrakt der Zellen, die mit NSA und Tetramin inkubiert worden waren, trotz verhältnismäßig geringer DPN-Konzentration eine starke Absorption bei 325 m μ im Cyanid-Test (s. „Methoden und Präparate“) aufwies. Da das Maximum der Absorption bei 340 m μ lag, konnte die Ursache der erhöhten Absorption nicht am Auftreten cyanidaddierender Bruchstücke des DPN, wie Nicotinsäureamid-mononucleotid und Nicotinamid-Ribosid liegen, da deren Absorptionsspektren ein Maximum bei 325 m μ im Cyanid-Test besitzen (COLOWICK et al. 1951).

II. Umsetzung von Nicotinsäureamid mit Tetramin und Synthese des Reaktionsproduktes

Nach Inkubation von NSA und Tetramin in Phosphat-Puffer bei verschiedenem p_H und anschließender Behandlung des Inkubationsansatzes mit KCN trat das gleiche Maximum im langwelligen UV bei 340 m μ auf, wie unter den Bedingungen des Warburg-Versuches (Tabelle 2). Spektrophotometrische Messung eines Inkubationsansatzes von NSA und Tetramin in Glykokoll-NaOH-Puffer p_H 11,0 ergab keine Absorption bei 340 m μ , so daß die Ausbildung des Maximums auf die Cyanid-Addition zurückzuführen ist und nicht auf den p_H der KCN-Lösung. Ohne KCN liegen die Absorptionsbanden, ebenso wie bei NSA, im Bereich von 260 m μ . Die Kinetik der Umsetzung von Tetramin mit NSA ließ sich an der Zunahme der UV-Absorption in Abhängigkeit von der Inkubationszeit im Cyanid-Test studieren. In Ansatz 1 (Abb. 2) wurden NSA und Tetramin im

molaren Verhältnis 8:1 umgesetzt, in Ansatz 2 im Verhältnis 1:8. Während einer Dauer von 20 Std wurden in verschiedenen Zeitabständen Proben entnommen und im Cyanid-Test bei 366 m μ gemessen. Nach etwa 8 Std war das Maximum der Umsetzung bei beiden Ansätzen erreicht. Die gemessene Extinktion entsprach einer Konzentration von etwa 0,8 μ Mol/ml, d. h., daß etwa 30% des eingesetzten Tetramins (Ansatz 1) umgesetzt wurden, da die Anfangskonzentration 2,5 μ Mol/ml betragen hatte.

Auf Grund der angeführten Untersuchungen und der von COLOWICK et al. (1951) studierten spektralen Eigenschaften der am Stickstoff des Pyridinrings substituierten NSA-Verbindungen nach KCN-

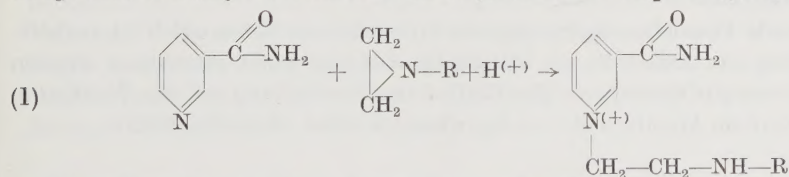
Tabelle 2. Wirkung von Tetramin auf Glykolyse und DPN-Spiegel von Yoshida-Asciteszellen und Beeinflussung der Reaktion durch NSA

Zur Manometrie, DPN-Bestimmung und Cyanid-Reaktion s. „Methoden und Präparate“. 0,52 ml Zellen pro Ansatz; Tetramin und NSA wie angegeben. Gesamtvolumen im Warburg-Gefäß: 6,0 ml. Die CO₂-Entwicklung in der 50.—80. min nach Start der Glykolyse wurde für die Berechnung der Glykolyse-daten ausgewertet.

Tetra- min	Endkonzentra- tion in mg-%		μ l CO ₂ /Std/ μ l Zellen $\times 10^3$	μ M DPN/ μ l Zellen $\times 10^3$	Gesamt- extinktion im Cyanid- test ¹ bei 325 m μ
	NSA				
0	0		701	0,043	0,279
0	100		517	0,050	0,301
20	0		0	0,003	0,248
20	100		440	0,020	1,962

¹ Die Extinktion im Cyanid-Test ist bezogen auf das Volumen des neutralisierten Trichlor-essigsäure-Extraktes.

Behandlung sowie der bekannten alkylierenden Wirkung von Äthylenimin (GILMAN und PHILIPS 1946) postulierten wir nach folgender Reaktionsgleichung die Bildung eines Tetramyl-Nicotinsäureamids (R bedeutet CH₂—CH(OH)—CH=CH₂):



Die Pyridiniumverbindung entsteht demnach durch Alkylierung des Pyridinstickstoffs des NSA, wobei der Äthylenimin-Ring des Tetramins geöffnet wird.

Weitere Hinweise für den angegebenen Reaktionsablauf waren das Auftreten einer intensiven Fluoreszenz nach Einwirkung von Aceton und Alkali und

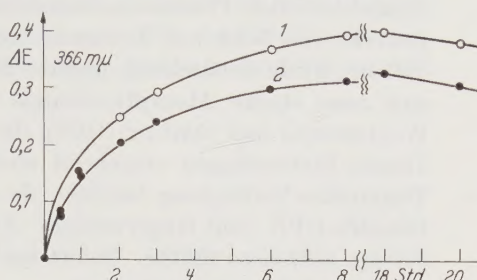


Abb. 2. Kinetik der Umsetzung von Tetramin mit NSA. 2,0 $\times 10^{-4}$ M Phosphatpuffer pH 6,0; T = 50°C. Ansatz 1: 240 μ Mol NSA; 30 μ Mol TA; Ansatz 2: 30 μ Mol NSA; 240 μ Mol TA. Gesamtvolumen der Ansätze 12,0 ml. Messung der entnommenen Proben im Cyanid-Test (s. „Methoden und Präparate“)

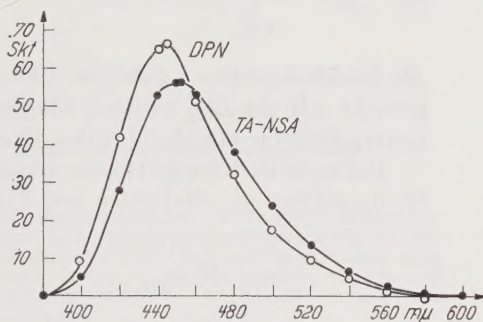
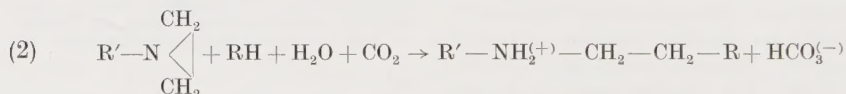


Abb. 3. Vergleich der Fluoreszenzemissionsspektren von DPN und TA-NSA. TA-NSA und DPN 6,5 $\times 10^{-5}$ M; T = 23°C; Gesamtvolumen 5,0 ml. Durchführung des Fluoreszenz-Testes siehe „Methoden und Präparate“

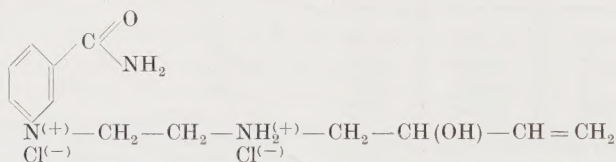
Anregung mit ultravioletttem Licht sowie das Auftreten einer neuen Absorptionsbande im Ultraviolett nach Behandlung des Reaktionsproduktes mit Dithionit. Diese vom DPN bekannten Reaktionen (BEISENHERZ et al. 1953; HUFF und PERLZWEIG 1947; OHLMEYER 1938) setzen eine Substitution des Pyridin-N voraus, d. h. das Vorliegen von Pyridinium-Verbindungen. Aus Abb. 3 sieht man die Ähnlichkeit der Fluoreszenzemissionsspektren von DPN und dem Reaktionsprodukt von NSA mit Tetramin nach Behandlung mit Aceton in alkalischem Milieu. Nach Behandlung unseres Reaktionsproduktes mit Dithionit entsteht eine neue starke Absorptionsbande mit einem Maximum bei $293\text{ m}\mu$. Nach WALLENFELS und SCHÜLY (1957), die derartige Hydrierungsprodukte von Pyridinium-Verbindungen eingehend studiert haben, könnte es sich hier um die Tetrahydro-Verbindung handeln, da die Dihydro-Verbindung in Analogie zum Dihydro-DPN ein längerwelliges Absorptionsmaximum in der Gegend von $360\text{ m}\mu$ aufweisen müßte. Sofort nach der Hydrierung ließ sich dessen vorübergehendes Auftreten nachweisen.

Die Alkylierungsreaktion kann auch durch den damit verknüpften Verbrauch von Säure manometrisch in der Warburg-Apparatur gemessen werden:



Als Reaktionsmilieu wurde eine Bicarbonatlösung verwendet, die sich im Gleichgewicht mit der CO_2 -haltigen Gasphase befand. Die Druckabnahme im Manometergefäß war ein Maß für den Säureverbrauch (vgl. HOLZER 1959).

Das nach Gleichung (1) zu erwartende Reaktionsprodukt wurde dann präparativ dargestellt (s. „Methoden und Präparate“).



Die Richtigkeit der angegebenen Formel ergab sich aus den Analysenwerten der C-, H- und N-Bestimmungen, der Bromtitration aliphatischer Doppelbindungen, der positiven Schotten-Baumann-Reaktion und Baeyerschen Probe. Das Absorptionsspektrum der Substanz ist zusammen mit dem der Cyanid-Verbindung in Abb. 1 wiedergegeben.

Orientierende Versuche zeigten, daß die Toxizität von Tetramyl-NSA verhältnismäßig gering ist. Dosen bis zu 350 mg/kg Körpergewicht intravenös wurden von Albinoratten gut vertragen. Ein Einfluß der Verbindung auf das Wachstum von Jensen-Sarkom konnte nicht nachgewiesen werden (KRÖGER 1959).

III. Alkylierung von Nicotinsäure durch Tetramin und präparative Darstellung des Alkylierungsproduktes

Analog der Umsetzung von NSA mit Tetramin wurde auch Nicotinsäure (3-Pyridin-Carbonsäure) bei pH 4,8 mit äquimolaren Mengen Tetramin 8 Std

bei 50° C inkubiert. Das Spektrum des Inkubationsansatzes zeigte nach Einwirkung von Cyanid nur geringe Absorption im Bereich von 290—380 m μ . Dies war jedoch zu erwarten, da für die Ausbildung der im langwelligen UV absorbierenden Cyanid-Additionsverbindung nach COLOWICK et al. (1951) die Säureamidgruppe erforderlich ist.

Es gelang zunächst nicht, die N-Tetramylnicotinsäure zu kristallisieren, deshalb wurde das Pikrat mit einer Ausbeute von 25% dargestellt (Schmelzpunkt 185—187° C; Synthes- und Analysendaten s. „Methoden und Präparate“).

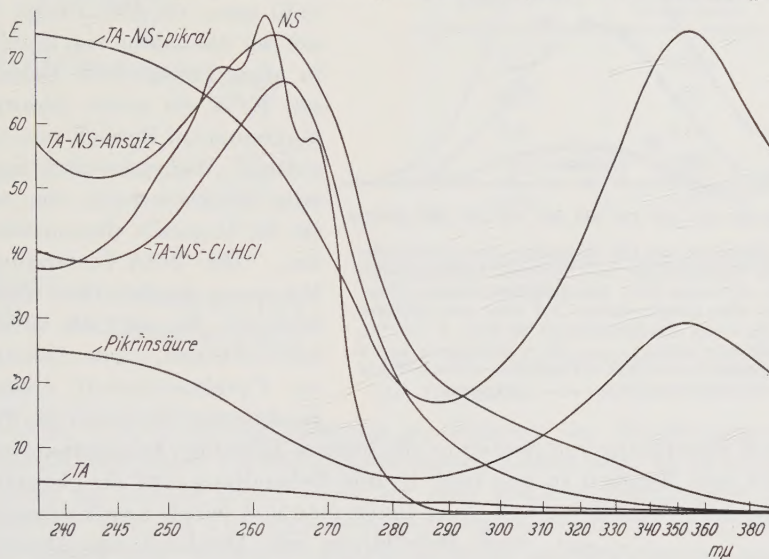


Abb. 4. Absorptionsspektren von N-Tetramylnicotinsäure-monopikrat, N-Tetramylnicotinsäurechlorid-hydrochlorid, Pikrinsäure, Nicotinsäure, Tetramin und eines Inkubationsansatzes von Nicotinsäure mit Tetramin. $6,6 \times 10^{-2}$ M Phosphatpuffer p_H 6,0, $13,0 \times 10^{-5}$ M TA-NS-monopikrat, etwa $0,3 \times 10^{-5}$ M TA-NS $\times$ Cl/HCl, $5,3 \times 10^{-5}$ M Pikrinsäure, $16,0 \times 10^{-5}$ M Nicotinsäure, $6,5 \times 10^{-5}$ M Tetramin, Inkubationsansatz von 2,0 M TA mit 0,9 M NS (2,5 Std bei p_H 4,8, 22—23° C). d = 1 cm; Gesamtvolumen 3,0 ml

Durch Zerlegung des N-Tetramylnicotinsäuremonopikrates mit halbkonzentrierter Salzsäure wurde mit 80%iger Ausbeute das N-Tetramylnicotinsäurechlorid-hydrochlorid gewonnen (Analysen und Ausführung der Zerlegung s. „Methoden und Präparate“).

Abb. 4 zeigt die Absorptionsspektren und Formeln des Tetramyl-Nicotinsäure-monopikrates und des Spaltproduktes sowie die Spektren von Pikrinsäure, Nicotinsäure, Tetramin und eines Inkubationsansatzes von Nicotinsäure mit Tetramin. Die identischen Spektren von Spaltprodukt und Inkubationsansatz zeigen nicht mehr die typischen drei Gipfel der Nicotinsäure, sondern nur noch ein Maximum bei 264 m μ . Einwirkung von Cyanid bewirkte kein Auftreten von Absorption im Bereich von 340 m μ .

IV. Alkylierung von NSA mit verschiedenen carcinostatisch wirksamen Äthylenimin- und N-Lost-Verbindungen

Die Alkylierung von Nicotinsäureamid erfolgte nicht nur mit dem von uns näher studierten Tetramin, sondern auch mit anderen carcinostatisch wirksamen

Äthylenimin- und N-Lost-Verbindungen. Inkubiert man Nicotinsäureamid mit Triäthylenmelamin (= TEM-Hoechst = 2,4,6-Triaziridino-1,3,5-Triazin), mit den N-Lost-Verbindungen Dichloren-CIBA (Methyl-bis-(β -chloräthyl)-amin), Endoxan-ASTA (N-bis-(β -chloräthyl)-N-propylen-phosphorsäurediamid) und mit der N-Oxyd-Lost-Verbindung Mitomen-ASTA (Methyl-bis-(β -chloräthyl)-amin-N-oxyd), so

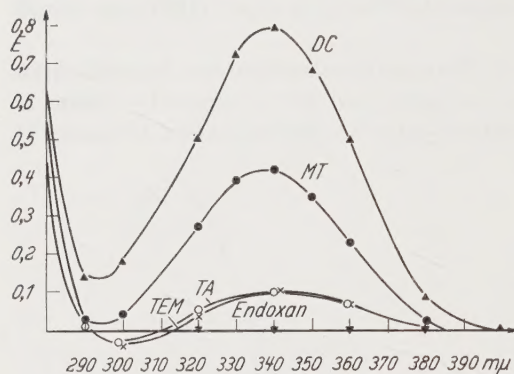


Abb. 5. Spektren der CN-Komplexe von Reaktionsprodukten verschiedener alkylierender Carcinostatica mit NSA. 6,6 μ Mol NSA pro Milliliter Ansatz; Konzentration aller Carcinostatica 3,3 μ Mol pro Milliliter Ansatz; $p_H = 6,0$. Inkubationszeit 90 min. $T = 37^\circ C$, Gesamtvolumen 3,0 ml. Δ — Δ DC = Dichloren; $\bullet$ — $\bullet$ MT = Mitomen; $\circ$ — $\circ$ TA = Tetramin; $\times$ — $\times$ TEM Triäthylenmelamin; $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ Endoxan

sieht man, wie Abb. 5 zeigt, daß — mit der Ausnahme von Endoxan — in allen Fällen nach Behandlung mit KCN ein neues Absorptionsmaximum im Bereich von 340 m μ auftritt. Wahrscheinlich liegt dieselbe Reaktionsweise vor, wie wir sie für Tetramin demonstriert haben. Die NSA-Verbindung des Mitomens wurde etwas näher untersucht. Sie zeigt die vorstehend beschriebenen, von der Substitution am Pyridinstickstoff abhängigen Reaktionen. So nimmt die Fluoreszenz nach Einwirkung von Aceton in alkalischem Milieu bei Inkubationsansätzen von NSA und Mitomen zu und nach Cyanid-Behandlung tritt die charakteristische Extinktion bei 340 m μ auf. Auch findet man in Analogie zum Tetramyl-NSA

nach Behandlung mit Dithionit ein Absorptionsmaximum bei 290—300 m μ . Endoxan gewinnt vermutlich erst nach hydrolytischer Öffnung der Phosphamid-Bindung alkylierende Eigenschaften (ARNOLD et al. 1961).

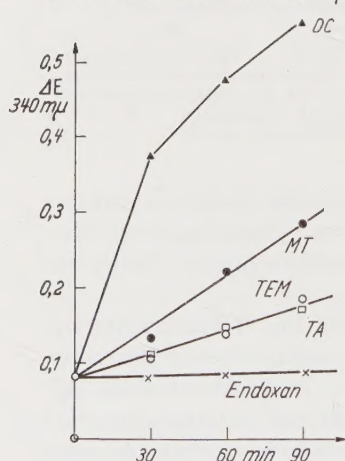


Abb. 6. Geschwindigkeit der NSA-Alkylierung durch verschiedene alkylierende Cytostatica. Versuchsbedingungen wie Abb. 5

Die Geschwindigkeit der NSA-Alkylierung ist für die einzelnen Cytostatica verschieden, wie Messungen der Extinktionszunahme im Cyanid-Test ergaben (Abb. 6). Wir machen jedoch bei diesem Vergleich die wahrscheinliche Annahme, daß die molaren Extinktionskoeffizienten der CN-Komplexe der N-alkylierten NSA-Verbindungen von derselben Größenordnung sind.

Vergleicht man die Alkylierungsgeschwindigkeiten von NSA mit den Konzentrationen der verschiedenen Cytostatica, die für die Glykolysehemmung von Ascites-Tumorzellen in vitro notwendig sind, so ergibt sich, wie Tabelle 3 zeigt, daß weitgehende Parallelität zwischen der biologischen Wirksamkeit

und der Alkylierungsgeschwindigkeit vorliegt. Dies sagt selbstverständlich nicht, daß speziell die von uns studierte Alkylierungsreaktion der carcinostatischen Wirkung zugrunde liege, sondern es gibt lediglich einen weiteren Hinweis zu der seit

Tabelle 3. Vergleich der Wirksamkeit einiger alkylierender Carcinostatica bei der Glykolysehemmung und der Alkylierung von Nicotinsäureamid

Zur manometrischen Bestimmung der anaeroben Glykolyse und Messung der Alkylierung im Cyanid-Test s. „Methoden und Präparate“. Konzentrationen im Inkubationsansatz beim Alkylierungstest: NSA 6,6 μ M/ml, Carcinostaticum 3,3 μ M/ml. Gesamtvolumen: 2,0 ml, T = 37° C, p_H = 6,0.

	Konzentration zur Glykolyse- hemmung (Mole/ Liter $\times 10^4$)	Wirksamkeit 1 Konzentration	Alkylierungs- geschwin- digkeit (Δ E 340 m μ pro 30 min)
Dichloren (CIBA) . . .	0,32	3,1	0,29
Mitomen (ASTA) . . .	2,2	0,45	0,07
TEM (Hoechst)	2,5	0,4	0,02
Tetramin (Merck/BASF)	2,6	0,38	0,03
Endoxan (ASTA) . . .	> 80	< 0,01	< 0,01

langem propagierten Theorie, daß die von uns studierten Carcinostatica durch ihre alkylierenden Eigenschaften die Tumoren beeinflussen.

V. p_H -Abhängigkeit der Alkylierungsreaktion von Nicotinsäureamid mit Tetramin, Mitomen und Dichloren

Aus Abb. 7 ist zu ersehen, daß das p_H -Optimum der Alkylierungsreaktion für alle drei untersuchten Verbindungen im sauren Bereich liegt. In der schnelleren Alkylierung im sauren Milieu sehen wir eine Erklärungsmöglichkeit für die Spezifität der Wirkung von alkylierenden Cytostatica auf Tumoren. Tumoren sind auf Grund ihrer Milchsäureproduktion durch aerobe Glykolyse saurer als normal wachsende Gewebe und so können die über die Blutbahn gleichmäßig verteilten Äthylenimin-Verbindungen in Tumorgeweben bevorzugt reagieren. Diese Überlegung gilt, ebenso wie das zu Tabelle 3 Diskutierte, nicht nur für die von uns studierte NSA-Alkylierung, sondern für Alkylierungsreaktionen aller Art.

VI. Manometrische Messung der Alkylierung von Stickstoffbasen durch Äthylenimin-Verbindungen

Daß die Alkylierungsreaktion nicht auf Nicotinsäureamid und Nicotinsäure beschränkt ist, konnte mit der auf Gleichung (2) beruhenden manometrischen Methode gezeigt werden (HOLZER 1959). Viele biologisch interessante stickstoffhaltige Verbindungen wie Aneurin, Lactoflavin und Pyridoxal reagieren mit verschiedenen carcinostatischen Äthylenimin-Verbindungen. Tabelle 4 zeigt, daß die Reaktion in allen Fällen bei p_H 6,0 schneller als bei p_H 7,4 verläuft.

VII. Vergleich zwischen Tetramin (1-Aziridino-2-hydroxybuten-3) und der entsprechenden gesättigten Verbindung 1-Aziridino-2-hydroxybutan

Das gesättigte Analoge des Tetramins bot die Möglichkeit, die Bedeutung der Vinylgruppe für die carcinostatische Wirkung zu prüfen. Tierversuche von OETTEL (1958) hatten ergeben, daß diese Verbindung auf das Wachstum von soliden Impftumoren keinen hemmenden Einfluß ausübt, woraus auf eine

Beteiligung der Vinylgruppe am cytostatischen Effekt des Tetramins geschlossen wurde. Eigene Untersuchungen (DUNTZE 1962) zeigten nun, daß die Alkylierung von NSA durch die gesättigte Verbindung hinsichtlich Geschwindigkeit (gleiche Extinktionskoeffizienten der CN-Komplexe der Alkylierungsprodukte bei 366 m μ vorausgesetzt) und p_H-Optimum gleich wie bei Tetramin verläuft. Auch bezüglich der Hemmung der aeroben Glykolyse und Senkung des DPN-Spiegels von Ascites-Tumorzellen in vitro ergab sich weitgehende Übereinstimmung beider

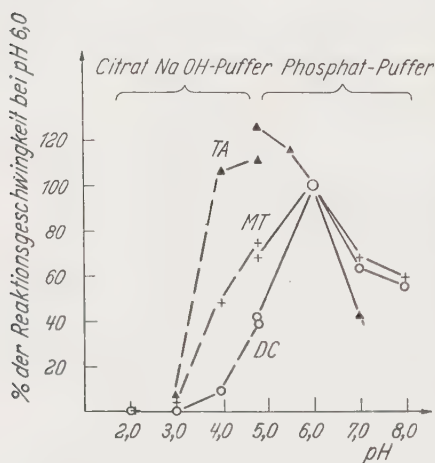


Abb. 7. p_H-Optimum der Alkylierungsreaktion. $3,0 \times 10^{-1}$ M Citratpuffer (p_H 3—5) bzw. $3,0 \times 10^{-1}$ M Phosphatpuffer (p_H 5—8). NSA, Tetramin, Dichlorn und Mitomen je $8,3 \times 10^{-3}$ M. Gesamtvolumen der Ansätze 0,6 ml. Die Extinktion (340 m μ) bei p_H 6,0 wurde gleich 100 % gesetzt

Verbindungen, was gegen einen stärkeren Einfluß der Vinylgruppe auf die Wirksamkeit spricht. Die funktionelle Gruppe dürfte demnach, wie bei vielen anderen krebshemmenden Substanzen, der Äthyleniminring sein. Dem übrigen Teil des Moleküls kommt nach unserer Ansicht lediglich eine die Verteilung im Organismus steuernde Funktion zu. Dies ist allerdings — wie wir gerne einräumen — eine Funktion, die für den Erfolg der Behandlung lebender Tiere von entscheidender Bedeutung ist.

VIII. Untersuchungen über die Bedeutung der Alkylierung von NSA, NS und anderen Stickstoffbasen für die carcinostatische Wirkung

Die direkte (nicht-enzymatische) Reaktion von Tetramin und anderen Carcinostatica mit NSA und Nicotinsäure zu

unphysiologischen Alkylierungsprodukten könnte eine Erklärung der Glykolysehemmung durch Senkung der DPN-Konzentration geben, da die DPN-Synthese durch Abfangen von NSA oder Nicotinsäure gestört wäre. Diese Annahme wurde auch durch die Übereinstimmung der Wirksamkeit verschiedener Carcinostatica bei Glykolysehemmung und NSA-Alkylierung gestützt (s. Tabelle 3). Die in Tabelle 2 gezeigte Schutzwirkung hoher NSA-Konzentrationen bei der Glykolysehemmung durch Tetramin ließe sich ebenfalls durch die direkte Alkylierung erklären. Auch die beschleunigte Bildung der Alkylierungsprodukte im schwach sauren Milieu (Abb. 7, Tabelle 4) spräche für einen solchen Mechanismus, da sie die bekannte Tumorspezifität von Tetramin erklärt. Im folgenden werden einige Versuche zur experimentellen Prüfung dieser Möglichkeit mitgeteilt.

Bei Untersuchungen der Glykolysehemmung durch Tetramin (z. B. unter den Bedingungen des Warburg-Versuches) müßte das Alkylierungsprodukt Tetramyl-NSA entsprechend dem Abfall der DPN-Konzentration gebildet werden. Dies gilt für die Annahme einer konstanten NSA-Konzentration in der Zelle; ist diese in der Lage, NSA schnell neu zu bilden (z. B. aus Tryptophan), so müßte der Senkung des DPN-Spiegels als Folge der Störung der Synthese die Anhäufung des Alkylierungsproduktes parallel gehen. Zur Analyse des gebildeten Tetramyl-NSA ergab sich aus methodischen Vorversuchen (DUNTZE 1962), daß Extrakten

Tabelle 4. Messung der Alkylierung von Stickstoffbasen durch Äthylenimin-Verbindungen mit der manometrischen Methode [s. Gleichung (2)]

Stickstoffbasen und Cytostatica 0,05 M; Na-Bicarbonat 0,026 M; Gas: 100% CO₂ für pH 6,0; 95% N₂+5% CO₂ für pH 7,4; T=37° C. Gesamtvolumen: 2,0 ml. Die Werte der Tabelle sind mm³ CO₂/Std/Ansatz. Mit der Druckänderung in einem Parallelansatz ohne die untersuchte Stickstoffbase wurde jeweils korrigiert.

Base	TEM (Hoechst)		Tetramin (Merck/BASF)		A 139 (Bayer)	
	pH 6,0	pH 7,4	pH 6,0	pH 7,4	pH 6,0	pH 7,4
Nicotinsäureamid	— 106	— 8	— 95	— 30	— 86	— 8
Nicotinsäure	— 274	— 18	— 197	— 77	— 215	— 4
Pyridoxin	— 221		— 88			
Pyridoxal	— 238				— 105	— 7
Histidin	— 169				— 69	— 10
Adenin	— 432		74			
Adenosin	— 13		— 71			
Aneurin	— 376				— 170	+ 17
Laktoflavin	— 94		— 102			
Folsäure	— 440				— 64	— 38
Pyridin	— 67		— 85			
Serotonin-Kreatinin-Sulfat	— 183	— 23				
Kreatinin	— 273	— 30				
Methionin	— 158	— 11	— 132	— 73	— 158	— 10
Cystein					— 190	— 12
Tryptamin					— 185	— 9
Kreatin					— 134	— 9
Lysin	— 423	— 36	— 174	— 88	— 175	— 2

aus Ehrlich-Asciteszellen bzw. Jensen-Sarkom-Gewebe zugesetztes Tetramyl-NSA zu mindestens 80% wiedergefunden wird; d. h., daß die Substanz nicht in den Zellen zerstört wird. Da HOLZER und BOLTZE (1961) zeigen konnten, daß Tetramyl-NSA nicht in Asciteszellen einzudringen vermag, wurde für die folgenden Untersuchungen vorausgesetzt, daß das bei einer Alkylierung des NSA in den Asciteszellen entstehende Alkylierungsprodukt nicht heraustreten könne und deshalb nachzuweisen sein müsse.

1. Quantitative Bestimmung der Bildung von Tetramyl-NSA unter den Bedingungen der Glykolysehemmung durch Tetramin. In den Versuchen der Kolonnen 1, 2 und 3 von Tabelle 5 wurde die Alkylierung von Nicotinsäureamid durch Tetramin-Konzentrationen studiert, die denjenigen bei den Warburg-Versuchen mit intakten Ascites-Tumorzellen entsprechen und dort ein Absinken der DPN-Konzentration auf wenige Prozent der Anfangskonzentration und damit eine

Tabelle 5. Alkylierung von NSA durch Tetramin unter den Bedingungen des Warburg-Versuches

2,0 × 10⁻⁵ Phosphatpuffer pH 6,0; T=37° C; Inkubationszeit 90 min. Das Ausmaß der Alkylierung wurde durch Extinktionsmessung bei 340 mμ nach Cyanid-Behandlung bestimmt (s. „Methoden und Präparate“).

	1	2	3	4
Endkonzentration im Ansatz				
Tetramin (μMol/ml)	1,77	1,77	1,77	177
NSA (μMol/ml)	82,0	8,2	0,82	0,82
Gebildetes Tetramyl-NSA (μMol/ml)	1,05	0,11	≤ 0,03	0,12
Gebildetes TA-NSA in Prozent der maximal möglichen Menge	60	6	≤ 4	15

völlige Hemmung der Glykolyse bewirken. Man sieht aus Kolonne 3, daß bei einer sehr niedrigen Nicotinsäureamid-Konzentration (die jedoch immer noch über derjenigen der lebenden Zellen und Gewebe liegt) weniger als 4% des Nicotinsäureamids alkyliert werden. Erst bei 10- bzw. 100fach höheren Nicotinsäureamid-Konzentrationen (vgl. Kolonnen 1 und 2) oder bei einer 100fach höheren Tetramin-Konzentration (vgl. Kolonne 4) tritt eine deutliche Alkylierung von Nicotinsäureamid auf. Wir schließen hieraus, daß eine nicht-enzymatische Alkylierung von Nicotinsäureamid nicht am carcinostatischen Wirkungsmechanismus von Tetramin beteiligt ist. Jedoch findet bei hohen Nicotinsäureamid-Konzentrationen, wie wir sie verwenden, um vor der Glykolysehemmung durch Äthylenimin-Verbindungen zu schützen (vgl. Tabelle 2), eine partielle „Entgiftung“ von Tetramin durch Alkylierung von Nicotinsäureamid statt (vgl. hierzu Kolonne 1). Eventuell hängt ein Teil der Schutzwirkung von Tetramin damit zusammen.

Tabelle 6. Wirkung von Tetramin auf die anaerobe Glykolyse und auf die Konzentrationen von DPN, Nicotinamid und Nicotinsäure in Ehrlich-Asciteszellen

Inkubation der Asciteszellen in Krebs-Ringer-Bicarbonat-Glucose-Lösung s. „Methoden und Präparate“. Gas: 100% CO₂; pH 6,0; T = 37° C. Start durch Einkippen von Tetramin. Nach Eintreten der Glykolysehemmung Unterbrechung des Versuches und Abtrennung der Zellen vom Suspensionsmedium durch Zentrifugieren bei 1200 × g. Bestimmung von DPN, NSA und NS in den Extrakten wie bei „Methoden und Präparate“ beschrieben.

Ansatz	Kontrolle		1	
Tetramin . . .	—		10 mg-%	
NSA	—		—	
Glykolysehemmung (%)	0		75	
	Zellen	Überstand	Zellen	Überstand
μMol DPN/ml	0,142	—	0,038	—
μMol NSA/ml .	0,137	0,372	0,224	1,458
μMol NS/ml . .	0,108	0,120	0,113	0,201

Tabelle 7. Vergleich der Fluoreszenzwerte in tetraminbehandelten Asciteszellextrakten vor und nach der Einwirkung von DPNase

Es wurden Zelleextrakte des in Tabelle 6 dargestellten Versuches verwendet. Pro Probe kamen 27 Aktivitätseinheiten (KAPLAN 1955) DPNase 20 min bei 37° C zur Einwirkung. Fluoreszenzmessung in den Extrakten wie unter „Methoden und Präparate“ beschrieben.

	Fluoreszenz vor Einwirken von DPNase	Fluoreszenz nach Einwirken von DPNase	Fluoreszenz im Überstand der Zellsuspension (ohne DPNase-Einwirkung)
Kontrolle	51 %	6 %	5 %
Ansatz mit 10 mg-% Tetramin	19 %	6 %	10 %

Gefäßen inkubiert. Hierauf wurden durch Zentrifugieren Zellen und Suspensionsmedium getrennt, mit 5%iger Trichloressigsäure abgestoppt und in den Extrakten DPN, NSA und NS bestimmt (s. „Methoden und Präparate“). Tabelle 6 zeigt, daß in den mit Tetramin gehemmten Zellen die DPN-Konzentration, wie zu erwarten, abgesunken ist. NSA ist nicht etwa verringert, wie man es bei einer die DPN-Synthese behindernden Alkylierung

2. Versuche eines Nachweises von Tetramyl-NSA in Ascites-Tumorzellen. Gewaschene Ehrlich-Asciteszellen wurden mit Tetramin bis zum Auftreten der Glykolysehemmung in Warburg-

durch Tetramin erwarten müßte, sondern erhöht. Dies weist auf eine Hemmung des enzymatischen NSA-Einbaues in DPN hin, die wir in späteren Arbeiten weiter studieren werden. Die Behandlung der in derartigen Versuchen gewonnenen Zellextrakte mit DPNase (Tabelle 7) zeigte, daß die Fluoreszenz des Extraktes der tetraminbehandelten Zellen auf den Wert der Kontrolle absinkt. Das heißt, die gesamte nach Alkali-Behandlung Fluoreszenz zeigende Substanz wird von DPNase zu nicht fluoreszierenden Produkten zersetzt. Da Tetramyl-NSA nicht von DPNase gespalten wird (DUNTZE 1962), kann es sich nicht um dieses handeln. Auch mit Hilfe der Papierchromatographie (DUNTZE 1962) und des Cyanid-Testes ließ sich kein Tetramyl-NSA im Extrakt der tetraminbehandelten Zellen nachweisen. Demnach sprechen auch diese Ergebnisse dagegen, daß die glykolysehemmende Wirkung des Tetramins auf einer Beeinflussung der DPN-Synthese durch Verbrauch von NSA bei der Alkylierung beruht.

IX. Ursache der Schutzwirkung von NSA auf die durch carcinostatische Äthylenimin-Verbindungen bewirkte Glykolysehemmung und Senkung des DPN-Gehaltes

Hohe Konzentrationen von NSA verhindern die Hemmung der aeroben Glykolyse und die Erniedrigung des DPN-Gehaltes nach Einwirkung von Äthyleniminen sowohl in vitro als auch in vivo (HOLZER et al. 1958; HOLZER u. KRÖGER 1958; ROITT 1956). Die in dieser Arbeit beschriebene direkte (nicht-enzymatische) Alkylierung des NSA durch Äthylenimin-Verbindungen könnte zur Entgiftung der Carcinostatica führen, andererseits ließe sich die Schutzwirkung der NSA auch durch eine Steigerung der Biosynthese des DPN erklären. Versuche hierzu ergaben (DUNTZE 1962), daß eine NSA-Konzentration, die die Glykolysehemmung tetraminbehandelter Asciteszellen auf etwa die Hälfte reduziert, noch keine Bildung von Tetramyl-NSA bewirkt. Erhöht man die NSA-Konzentration bis zur völligen Aufhebung der Glykolysehemmung, so lassen sich auch dann nur 13% des eingesetzten Tetramins als Tetramyl-NSA nachweisen. Die restlichen 87% des Tetramins würden jedoch für eine Glykolysehemmung in kurzer Zeit ausreichen. Deshalb kann die „Schutzwirkung“ von NSA nicht auf die Acceptorfunktion bei der Alkylierung durch Tetramin zurückzuführen sein. Dies wird weiter belegt durch Untersuchungen von HOLZER und BOLTZE (1961), wonach verschiedene N-Basen, die ebenso schnell bzw. schneller als NSA durch Tetramin alkyliert werden, keinerlei Schutzwirkung ausüben, da sie nicht zur Erhöhung des DPN-Gehaltes fähig sind. Die Fähigkeit, die DPN-Synthese zu stimulieren, und nicht die Eigenschaft, als Acceptor für die Alkylierung durch Äthylenimin-Verbindungen zu dienen, ist also die Ursache des Schutzeffektes bei der Glykolysehemmung. Ein durch Alkylierung bedingter Mangel des für die Biosynthese als Baustein notwendigen NSA läßt sich demnach als Mechanismus der Wirkung von carcinostatischen Äthylenimin-Verbindungen ausschließen.

Diskussion

Die Beobachtung der direkten (nicht-enzymatischen) Reaktion zwischen cytostatisch wirksamen Äthylenimin-Verbindungen und Stickstoffbasen erschien vor allem interessant für den speziellen Fall des Nicotinsäureamids, da frühere Untersuchungen (HOLZER et al. 1958; HOLZER u. KRÖGER 1958; ROITT 1956)

über die Beeinflussung des Tumorwachstums durch Carcinostatica gezeigt hatten, daß dabei der DPN-Stoffwechsel beeinträchtigt wird. Da Versuche von BARCLAY et al. (1958) und SCRIBA et al. (1960) über die Beeinflussung der Enzyme des DPN-Stoffwechsels durch verschiedene Carcinostatica keine weiteren Anhaltspunkte ergaben, war die Möglichkeit einer direkten Einwirkung der Cytostatica auf das DPN oder seine Bausteine zu erwägen. Die in dieser Arbeit beschriebene Alkylierung von Nicotinsäureamid und Nicotinsäure durch Äthylenimin-Verbindungen hätte einen solchen Mechanismus erklären können. Daß bei Tumorpatienten charakteristische Nicotinsäureamid-Mangelerscheinungen nach Behandlung mit cytostatisch wirksamen Äthylenimin-Verbindungen beobachtet wurden (GERLICH 1958), gab einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung Nicotinamid-verbrauchender Reaktionen am carcinostatischen Wirkungsmechanismus: jedoch ließ sich in Ascites-Tumorzellen in vitro keine Alkylierung von NSA und Nicotinsäure mit Konzentrationen von Tetramin nachweisen, die eine Glykolysehemmung bewirken. Da sich zudem die Geschwindigkeit der Alkylierungsreaktion als wesentlich geringer erwies als der in den Zellen bewirkte DPN-Abfall, und eine enzymatische Katalyse der Alkylierung ausgeschlossen werden konnte, kann zusammenfassend geschlossen werden, daß das Absinken des DPN-Spiegels nach Tetramin-Einwirkung nicht die Folge einer Alkylierung von NS oder NSA ist.

Untersuchungen von KRÖGER et al. [(1) 1960; (2) 1960] deuten darauf hin, daß die Biosynthese des DPN wahrscheinlich durch Angriff an einem Enzym, das einen der ersten Schritte des DPN-Aufbaues katalysiert, gehemmt wird. Dadurch wird der Einbau von NSA oder NS in DPN gestört (Zusammenfassung s. HOLZER 1961). Vermutlich wird ein besonders empfindliches Enzym der DPN-Synthese durch Alkylierung inaktiviert. Vieles spricht dafür, daß auch Wasserstoffsuperoxyd an dieser Stelle die DPN-Synthese und damit die Glykolyse hemmt (GLOGNER 1960; HOLZER u. FRANK 1958).

Daß Glykolysehemmung und Verminderung des DPN-Gehaltes nach Einwirkung von Äthylenimin durch hohe Konzentrationen NSA verhindert werden, beruht ebenfalls nicht auf einer Entgiftung der Cytostatica durch Alkylierung. Wie die in Kapitel VIII geschilderten Versuche in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen [HOLZER u. BOLTZE 1961; KRÖGER et al. (1) 1960; (2) 1960] zeigen, beruht die Schutzwirkung von NSA vielmehr auf seiner Beteiligung an der DPN-Synthese und Hemmung des DPN-Abbaus.

Zusammenfassung

Die Alkylierung von Nicotinsäureamid, Nicotinsäure und einigen anderen biologisch wichtigen Substanzen durch verschiedene Äthylenimin- und N-Lost-Verbindungen wurde studiert.

Methoden zur quantitativen Messung der Alkylierung sowie die Synthese der Alkylierungsprodukte von Nicotinsäureamid und Nicotinsäure mit der Äthylenimin-Verbindung Tetramin werden beschrieben.

Es wird gezeigt, daß die Alkylierung von Nicotinsäureamid und Nicotinsäure nicht am carcinostatischen Wirkungsmechanismus von Tetramin beteiligt ist.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Bundesministerium für Atomkernenergie und Wasserwirtschaft, sowie dem Badischen Landesverband zur Bekämpfung des Krebses danken wir für Beihilfen, die die vorliegende Arbeit ermöglicht haben.

Summary

The alkylation of nicotinamide, nicotinic acid and other biologically important substances by different ethyleneimine-compounds and N-mustards was studied.

Methods for the quantitative measurement of the alkylation and the synthesis of the products of alkylation of nicotinamide und nicotinic acid by the ethyleneimine compound tetramine are described.

It is shown that the alkylation of nicotinamide and nicotinic acid is not involved in the carcinostatic mechanism of tetramine.

Literatur

- ARNOLD, H., F. BOURSEAUX u. N. BROCK: Über Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und cancerotoxischer Wirkung in der Reihe der Phosphamidester des Bis-(β -chlor-äthyl)-amins. *Arzneimittel-Forsch.* **11**, 143 (1961).
- BARCLAY, R. K., M. PHILIPPS and M. BARCLAY: Diphosphopyridine nucleotide metabolism in tumor-bearing mice, and effects of tumor inhibitors thereon. IV. Internat. Kongr. für Biochemie Wien. Abstracts, p. 79. London-New York-Paris-Los Angeles 1958.
- BEISENHERZ, G., H.-J. BOLTZE, TH. BÜCHER, R. CZOK, K. H. GARBADÉ, E. MEYER-ARENDT u. G. PFLEIDERER: Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceralddehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. *Z. Naturforsch.* **8b**, 555 (1953).
- BURCHENAL, J. H., M. L. CROSSLEY, C. CHESTER STOCK and C. P. RHOADS: The action of certain ethyleneimine (aziridine) derivatives on mouse leukemia. *Arch. Biochem. Biophys.* **26**, 321 (1950).
- COLOWICK, S. P., N. O. KAPLAN and M. M. CIOTTI: The reaction of pyridine nucleotide with cyanide and its analytical use. *J. biol. Chem.* **191**, 447 (1951).
- DUNTZE, W.: Versuche zur Alkylierung von Nikotinamid und Nikotinsäure durch Tetramin und andere carcinostatische Verbindungen. Diss. Medizinische Fakultät der Universität Freiburg i. Br. 1962.
- GERLICH, N. (Städtische Krankenanstalten Bielefeld): Persönliche Mitteilung 1958.
- GILMAN, A., and F. S. PHILIPS: The biological actions and therapeutic applications of the B-chloroethyl amines and sulfides. *Science* **103**, 409 (1946).
- GLOGNER, P., H. P. WOLF u. H. HOLZER: Einfluß von Methylenblau auf Glykolyse und Atmung von Ascites-Tumorzellen. *Biochem. Z.* **332**, 407 (1960).
- GOEDDE, H. W., u. H. HOLZER: Alkylierung von Nicotinsäureamid durch carcinostatisch wirksame Äthyleniminverbindungen. XVII. Internat. Kongr. für Reine und Angew. Chemie, München 1959. Referat siehe *Angew. Chem.* **72**, 74 (1960).
- HOLZER, H.: Alkylierung von Nicotinsäure und Nicotinsäureamid durch verschiedene Carcinostatica. *Klin. Wschr.* **37**, 679 (1959).
- Wirkungsmechanismus der Zytostatika. *Dtsch. med. J.* **12**, 312 (1961).
- , u. H.-J. BOLTZE: Über die Wirkung von Nicotinsäureamid auf die Glykolyse-Hemmung von Ascites-Tumorzellen durch Äthylenimin-Verbindungen. *Z. Krebsforsch.* **64**, 113 (1961).
- W. DUNTZE u. S. FRANK: Zum carcinostatischen Wirkungsmechanismus von Äthylenimin-Verbindungen: Alkylierung von Nicotinsäureamid am Pyridin-Stickstoff. *Angew. Chem.* **70**, 746 (1958).
- , u. S. FRANK: Zum Mechanismus der Wirkung von Röntgenstrahlen auf Krebszellen. *Angew. Chem.* **70**, 570 (1958).
- P. GLOGNER u. G. SEDLMAYER: Zum Mechanismus der Glykolysehemmung der carcinostatisch wirkenden Äthyleniminverbindungen. *Biochem. Z.* **330**, 59 (1958).
- ST. GOLDSCHMIDT, W. LAMPRECHT u. E. HELMREICH: Bestimmung stationärer Zwischenstoffkonzentrationen. I. Bestimmung stationärer DPN/DPNH-Konzentrationen in lebenden Zellen und Geweben. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **297**, 1 (1954).
- , u. H. KRÖGER: Zum carcinostatischen Wirkungsmechanismus von Äthylenimin-Verbindungen. *Biochem. Z.* **330**, 579 (1958).

- HUFF, J. W., and W. A. PERLZWEIG: The fluorescent condensation product of N¹-methyl-nicotinamide and acetone. II. A sensitive method for the determination of N¹-methyl-nicotinamide in urine. *J. biol. Chem.* **167**, 157 (1947).
- KAPLAN, N. O.: Animal Tissue DPNase (Pyridine Transglycosidase). In: *Methods in Enzymology* (herausgeg. von S. P. COLOWICK u. N. O. KAPLAN), vol. II, p. 660. New York: Academic Press 1955.
- KÖNIG, W.: Über eine neue, vom Pyridin derivierende Klasse von Farbstoffen. *J. prakt. Chem.* **69**, 105 (1904).
- KRÖGER, H.: Unveröffentlichte Versuche 1959.
- H. W. ROTTHAUWE, B. ULRICH u. H. HOLZER: Zum Einfluß von Carcinostatica auf den DPN-Stoffwechsel der Tumoren. I. Einbau von ¹⁴C-Ribose und ¹⁴C-Nicotinsäureamid in das DPN von Asciteszellen. *Biochem. Z.* **333**, 148 (1960).
- — — Zum Einfluß von Carcinostatica auf den DPN-Stoffwechsel der Tumoren. II. Nachweis von DPN-Bausteinen in Asciteszellen. *Biochem. Z.* **333**, 155 (1960).
- LISBOA, B. P.: Quantitative Bestimmung von Nicotinamid (NA) in Gegenwart von Nicotinsäure (NS). *Naturwissenschaften* **44**, 617 (1957).
- OETTEL, H.: Tierexperimentelle Beiträge zur Chemotherapie des Krebses: *Angew. Chem.* **71**, 222 (1959).
- , u. G. WILHELM: Wege zur Chemotherapie des Krebses. *Arzneimittel-Forsch.* **4**, 691 (1954).
- — Vergleichende Prüfung von 14 cytostatisch wirksamen Produkten auf Tiertumoren. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.* **230**, 559 (1957).
- OHLMEYER, P.: Darstellung von reiner Dihydrocozymase in Substanz. *Biochem. Z.* **297**, 66 (1938).
- ROITT, I. M.: The inhibition of carbohydrate metabolism in ascites-tumour cells by ethyleneimines. *Biochem. J.* **63**, 300 (1956).
- ROSE, F. L., J. A. HENDRY and A. L. WALPOLE: New cytotoxic agents with tumour-inhibitory activity. *Nature (Lond.)* **165**, 993 (1950).
- SCHMIDT, C. G.: Zur Frage der Erniedrigung der DPN-(Diphosphopyridinnucleotid-)Konzentration in Tumoren durch Cytostatica. *Klin. Wschr.* **37**, 91 (1959).
- SCRIBA, P., S. SCHNEIDER u. H. HOLZER: Zur Wirkung von 2,5-Dimethoxy-äthoxy-3,6-bis-äthyleniminobenzochinon-1,4 (Bayer A 139) auf die Glykolyse von Ascites-Tumorzellen. *Z. Krebsforsch.* **63**, 547 (1960).
- VIERLING, K., H. OETTEL u. G. WILHELM: Verfahren zur Herstellung von stickstoffhaltigen Anlagerungsverbindungen. *D. B. P.* 1.004.614, 1957.
- WALLENFELS, K., u. H. SCHÜLY: Über den Mechanismus der Wasserstoffübertragung mit Pyridinnucleotiden. VI. Die chemische Natur des Säureproduktes hydrierter Pyridiniumverbindungen und ein Vorschlag für einen Mechanismus der enzymatischen Reduktion von Brenztraubensäure und Phosphoglycerinsäure. *Biochem. Z.* **329**, 75 (1957).

Prof. Dr. H. HOLZER,

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität, Freiburg i. Br.

Lebenslauf

Am 11. Oktober 1937 wurde ich, WOLFGANG WILHELM DUNTZE, als fünftes Kind des damaligen Oberregierungsrates JOHANNES DUNTZE und seiner Ehefrau MARGARETE, geb. LIERMANN, in Karlsruhe geboren. Nach dem Besuch der Volksschule in Karlsruhe trat ich dort in das humanistische Gymnasium ein. Die Reifeprüfung legte ich 1956 am Eberhard-Ludwigs-Gymnasium in Stuttgart ab, das ich seit 1953 besuchte. Anschließend begann ich zunächst in Göttingen, dann in Freiburg mit dem Studium der Medizin. Nach Ablegung der medizinischen Vorprüfung im Sommer 1958 begann ich mit den Untersuchungen zu der vorliegenden Dissertationsarbeit, die in der Zeit vom 15. September 1958 bis zum 30. September 1959 am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Freiburg i. Br. durchgeführt wurden.